

<b>СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК</b>			
<b>Док. № PNL33</b>	<b>Вер. № 02</b>	<b>Дата вступления в силу: 12/7/2021</b>	<b>Страница 1 из 24</b>

1. **Цель:** описать первичную стандартную операционную процедуру (СОП) для ручного выделения тотальной ДНК из чистых одноклонных изолятов кишечных бактерий с помощью набора Qiagen DNeasy Blood & Tissue и контроля качества (КК) очищенных экстрактов с помощью Nanodrop и Qubit для целей полногеномного секвенирования (WGS). Данный СОП способствует межлабораторному сопоставлению результатов секвенирования.
  
2. **ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ:** Предназначен для использования участниками PulseNet при проведении ручного выделения ДНК из энтеральных организмов для последующего представления данных WGS в национальные базы данных PulseNet и NCBI. Лаборатории могут вносить изменения в данную процедуру по мере необходимости после валидации или использовать альтернативный метод (автоматизированный метод выделения ДНК) в соответствии с рекомендациями своей лаборатории, соблюдая минимальные требования к качеству и количеству ДНК, указанные в данном СОП.
  
3. **ОПРЕДЕЛЕНИЯ:**
  - 3.1. **AE:** элюирующий буфер
  - 3.2. **AL:** Буфер для лизиса
  - 3.3. **ATL:** Буфер для лизиса тканей
  - 3.4. **AW1:** Промывочный буфер 1
  - 3.5. **AW2:** Промывочный буфер 2
  - 3.6. **BR:** широкий диапазон
  - 3.7. **BSC:** шкаф биологической безопасности
  - 3.8. **BSL2:** Уровень биобезопасности 2
  - 3.9. **ДНК:** Дезоксирибонуклеиновая кислота
  - 3.10. **ДНКза:** Дезоксирибонуклеаза
  - 3.11. **dsDNA:** Двухцепочечная ДНК
  - 3.12. **EDTA:** этилендиаминтетрауксусная кислота
  - 3.13. **ELB:** Буфер для ферментативного лизиса
  - 3.14. **GHS:** Согласованная на глобальном уровне система
  - 3.15. **HS:** высокая чувствительность
  - 3.16. **NCBI:** Национальный центр биотехнологической информации
  - 3.17. **ПЦР:** Полимеразная цепная реакция
  - 3.18. **PHL:** Лаборатория общественного здравоохранения
  - 3.19. **СИЗ:** средства индивидуальной защиты
  - 3.20. **PulseNet Central:** Группа PulseNet в CDC, состоящая из отдела по выявлению и надзору за вспышками и отдела по методам субтипирования следующего поколения
  - 3.21. **КК:** Контроль качества
  - 3.22. **RNase:** Рибонуклеаза
  - 3.23. **SDS:** паспорт безопасности
  - 3.24. **SOP:** Стандартная операционная процедура
  - 3.25. Этап подготовки библиотеки секвенирования, в ходе которого ДНК фрагментируется и помечается адаптерными последовательностями
  - 3.26. **Tris-HCl:** Трис гидрохлорид
  - 3.27. **TSA-SB:** Триптиказо-соевый агар с 5% овечьей крови

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 2 из 24

3.28. **WGS:** Полногеномное секвенирование

#### 4. ОБЯЗАННОСТИ:

##### 4.1. Лаборатория общественного здравоохранения PulseNet:

- 4.1.1. Выполнять выделение очищенной ДНК и контроль качества из чистых одноклональных изолятов энтеральных бактерий для WGS, как описано в данном СОП.
- 4.1.2. При необходимости свяжитесь с PulseNet Central для получения помощи по данному СОП, при подозрении на проблемы с реагентами и/или при подозрении на проблемы с приборами.

##### 4.2. PulseNet Central:

- 4.2.1. Предоставляет лабораториям общественного здоровья (PHL) поддержку по устранению неисправностей по мере необходимости.
- 4.2.2. При необходимости сообщать PHL о любых подозрительных проблемах с реагентами.
- 4.2.3. Регулярно поддерживайте и пересматривайте СОПы и размещайте их на SharePoint

#### 5. БЕЗОПАСНОСТЬ:

5.1. **Предупреждение о биобезопасности:** Патогены, передающиеся через пищевые продукты, способны вызывать серьезные заболевания. Всегда используйте шкаф минимум уровня BSL2 и будьте предельно осторожны при передаче и работе со штаммами этого типа. При работе с инфекционными организмами надевайте соответствующие СИЗ. Работайте в ШББ при работе с организмами с низкой инфекционной дозой. Дезинфицируйте или утилизируйте всю пластиковую и стеклянную посуду, на которую попали бактериальные культуры.

5.2. **Предупреждение о химической безопасности:** Соблюдайте необходимые меры предосторожности и надевайте соответствующие СИЗ при работе с потенциально опасными химическими веществами. Убедитесь, что химические вещества, использованные контейнеры и неиспользованное содержимое утилизируются в соответствии с государственными стандартами безопасности.

- 5.2.1. РНКза А относится к категории 1 по классификации GHS как реагент, вызывающий сенсibilизацию кожи и дыхательных путей. Более подробную информацию см. в SDS.
- 5.2.2. Компоненты набора Qiagen DNeasy Kit: Дополнительную информацию см. в SDS компании Qiagen.
  - 5.2.2.1. **Буфер AL:** GHS Категория 2 относительно раздражения кожи и глаз. GHS Категория 1 по сенсibilизации кожи. Содержит хаотропную соль и не совместим с препаратами, содержащими отбеливатель.
  - 5.2.2.2. **Буфер AW1:** GHS Категория 4 для острой пероральной и ингаляционной токсичности. GHS Категория 2 относительно раздражения кожи и глаз.

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 3 из 24

Содержит хаотропную соль и не совместим со средствами, содержащими отбеливатель.

- 5.2.2.3. **Протеиназа К:** Категория 1 GHS по сенсibilизации дыхательных путей.
- 5.2.3. Этанол легко воспламеняется (GHS Категория воспламеняемости 2); соблюдайте меры предосторожности при обращении, хранении и утилизации этанола в лаборатории.

## 6. РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ И ОБОРУДОВАНИЕ

### 6.1. Реактивы

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Все реактивы хранятся при температуре 20-25°C, если не указано иное. Если не указано иное, соблюдаются сроки годности, указанные производителем.

- 6.1.1. TSA-SB или аналогичная среда (Fisher Scientific Cat# B21239X, упаковка 20 или эквивалент). Хранить при температуре 4-8°C.
- 6.1.2. Этанол, молекулярный 95-100% (Fisher Scientific Cat# BP2818-500 или эквивалент).
- 6.1.3. РНКаза А, 100 мг/мл (Qiagen Cat# 19101, 2,5 мл или эквивалент). Информацию о безопасности см. в разделе 5.2.1.
- 6.1.4. Вода молекулярного качества, не содержащая ДНК (Fisher Scientific Cat# BP24701, 1 л или эквивалент. Также подходит вода, отфильтрованная Millipore).
- 6.1.5. Трис-HCL, 1 М, рН 8,0 (Fisher Scientific Cat# 15568-025, 1 л или эквивалент).
- 6.1.6. Лизоцим (Millipore Sigma Cat# L4919-1G или эквивалент), хранить при -20°C.
- 6.1.7. ЭДТА, 0,5 М (Millipore Sigma Cat# 324506-100ML)
- 6.1.8. Тритон X-100 (Fisher Scientific Cat# BP151-100, 100 мл)
- 6.1.9. Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen Cat# 69504 (50 экстрактов) или 69506 (250 экстрактов))
- 6.1.9.1. Буфер AL (информацию о безопасности см. в разделе 5.2.2.1)
- 6.1.9.2. Буфер ATL
- 6.1.9.3. Протеиназа К (см. раздел 5.2.2.3 для получения информации о безопасности)
- 6.1.9.4. Буфер AWI (см. раздел 5.2.2.2 для получения информации о безопасности)
- 6.1.9.5. Буфер AW2
- 6.1.9.6. Пробирки для сбора
- 6.1.9.7. Спин-колонки
- 6.1.10. Qubit dsDNA BR Assay Kit (Fisher Scientific Cat# Q32850 (100 анализов) или Q32853 (500 анализов))
- 6.1.10.1. Реагент dsDNA BR (компонент А). Защищать от света.
- 6.1.10.2. Буфер для dsDNA BR (компонент В).
- 6.1.10.3. Стандарт dsDNA BR №1 (компонент С). Хранить при температуре 2-8°C.
- 6.1.10.4. Стандарт dsDNA BR №2 (компонент D). Хранить при 2-8°C.
- 6.1.11. **ВАРИАНТ:** Наборы для анализа dsDNA Qubit 1X, широкий диапазон (BR) (Fisher Scientific Cat# Q33265 (100 анализов) или Q33266 (500 анализов)).
- 6.1.12. **ВАРИАНТ:** Набор для очистки и концентрации геномной ДНК® -5 (Zymo Research Cat# D4013 (50 препов) или D4014 (200 препов)).
- 6.1.13. **ВАРИАНТ:** Набор Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega Cat# A1120 (100 экстрактов) или A1125 (500 экстрактов)).

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 4 из 24

6.1.13.1. Дополнительные реагенты и материалы, необходимые для набора Promega:

6.1.13.1.1. Изопропанол 99-100 % (Fisher Scientific Cat# BP26324, 4 л)

6.1.13.1.2. Лед

## 6.2. Принадлежности

- 6.2.1. Петли для инокуляции объемом 1 мкл (Fisher Scientific Cat# 22-363-604, упаковка 960 или эквивалент)
- 6.2.2. Микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл (Fisher Scientific Cat# 05-408-129, упаковка 500 или эквивалент) **ПРИМЕЧАНИЕ:** *Перед использованием стерилизуйте эти пробирки в автоклаве.*
- 6.2.3. Пробирки объемом 5 мл (Fisher Scientific Cat# 14-959-11A, упаковка 500 шт. или эквивалент)
- 6.2.4. Наконечники для пипеток, с фильтром: 10 мкл, 20 мкл, 200 мкл и 1000 мкл (Rainin Cat# 30389225, 30389239 и 30389212 или эквивалент).
- 6.2.5. Пробирки для анализа Qubit [Fisher Scientific Cat# Q32856, упаковка 500 или эквивалент (прозрачные тонкостенные пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл)].
- 6.2.6. Безворсовые лабораторные салфетки (Fisher Scientific Cat# 06-666C, упаковка 140 или эквивалент).

## 6.3. Оборудование

- 6.3.1. Инкубатор (35-37°C)
- 6.3.2. Вихревая центрифуга (вортекс)
- 6.3.3. Водяная баня (бани) или термоблок (термоблоки), вмещающий 1,5 мл микроцентрифужные пробирки и способный поддерживать температуру 56°C ± 1°C
- 6.3.4. Центрифуга, вмещающая пробирки объемом 1,5-2 мл и обеспечивающая скорость вращения до 13 000-14 000 об/мин
- 6.3.5. Аналитические весы с точностью до 0,1 мг
- 6.3.6. Микропипетки, одноканальные: 10 мкл, 20 мкл, 200 мкл, 1000 мкл
- 6.3.7. Флуорометр Qubit™ 4.0 (старые версии 2.0 или 3.0) или эквивалент для количественного определения dsDNA
- 6.3.8. Спектрофотометр NanoDrop™ 2000 UV-Vis/NanoDrop™ One или эквивалент для определения показаний 260/280 нм.

## 7. ПРОЦЕДУРЫ

7.1. **Подготовка изолята:** Секвенирование должно проводиться из одного образца колонии. Подготовьте изолированные колонии, разделив планшет для выделения и проверки чистоты из исходного образца в соответствии с методами вашей лаборатории.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Сведите к минимуму количество переходов от образца к планшету для выделения ДНК.*

7.1.1. Перенесите изолированную колонию из чистого планшета на планшет TSA-SB (или аналогичную среду) и инкубируйте при 37°C ± 1 в течение 16-24 часов.

7.2. **Выделение ДНК с помощью набора Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit**

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 5 из 24

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** При использовании процедуры выделения ДНК Promega Wizard® см. приложение PNL33-1. Для завершения процесса с использованием этого набора необходимо выделить не менее 4-6 часов.

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Экстракты ДНК, которые будут использоваться для подготовки библиотек WGS и секвенирования, не должны содержать ЭДТА. Было установлено, что это химическое вещество ингибирует некоторые процессы в процессе подготовки библиотеки (например, мечение) и содержится в буферах для элюирования/регидратации многих коммерческих наборов. ЭДТА инактивирует ферменты и/или буферы путем хелатирования с ионами металлов, содержащимися в этих реагентах. По этой причине в качестве элюирующего буфера используется 10 мМ Трис-НСl, рН 8,0, а не элюирующий буфер, входящий в набор для экстракции.

#### 7.2.1. Прежде чем приступить к этой процедуре:

- 7.2.1.1. Предварительно нагрейте водяную баню или термоблок до 56°C ± 1.
- 7.2.1.2. Убедитесь, что реагенты набора DNeasy подготовлены. Если нет, при необходимости разбавьте их этанолом (молекулярный класс 95-100 %), следуя протоколу, указанному во вкладыше к набору. После разбавления поставьте на флаконах инициалы и дату, указывающие на то, что реагенты готовы к использованию.
- 7.2.1.3. Приготовьте элюирующий буфер, 10 мМ Tris HCl рН 8,0, следующим образом:
  - 7.2.1.3.1. Добавьте 10 мл 1 М Трис-НСl, рН 8,0 к 990 мл воды молекулярного класса.
  - 7.2.1.3.2. Переверните несколько раз, чтобы перемешать.
  - 7.2.1.3.3. Хранить при температуре 2-8°C до одного года (на флаконе указать инициалы, дату приготовления и дату истечения срока годности).

#### 7.2.2. Лизис клеток грамположительных организмов:

- 7.2.2.1. Приготовьте буфер для ферментативного лизиса (ELB), состоящий из 20 мМ Трис-НСl, 2 мМ ЭДТА, 1,2 % Тритона:
  - 7.2.2.1.1. Соедините следующее:
    - 5 мл 1 М Трис-НСl, рН 8,0
    - 1 мл 0,5 М ЭДТА
    - 3 мл Тритон Х-100
    - 241 мл воды молекулярного класса
  - 7.2.2.1.2. Аккуратно перемешайте, чтобы включить Тритон Х (при желании это можно сделать с помощью мешалки и планшета для перемешивания). Хранить при комнатной температуре до одного года.
- 7.2.2.2. Приготовьте раствор ELB-лизоцима, добавив лизоцим к соответствующему объему ELB для достижения концентрации лизоцима 20 мг/мл. В качестве ориентира можно использовать таблицу ниже. Тщательно перемешайте раствор ELB с лизоцимом перед дозированием.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК**

Док. № PNL33

Вер. № 02

Дата вступления в силу:  
12/7/2021Страница 6 из  
24

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** Повышение эффективности наблюдалось после того, как раствор ELB-Lysozute инкубировался при комнатной температуре в течение 20-30 минут.

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Раствор должен быть использован в течение 24 часов после приготовления.

Количество образцов + 1 дополнительный	Общий объем ELB (мкл)	Лизоцим (мг)
(5+1) = 6	1080	21.6
(10+1) = 11	1980	39.6
(18+1) = 19	3420	68.4
(20+1) = 21	3780	75.6

**Таблица 1:** Общий объем ELB и лизоцима, необходимый для разного количества образцов

- 7.2.2.3. Внесите 180 мкл подготовленной смеси ELB и лизоцима в каждую промаркированную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.
- 7.2.2.4. Заполните инокуляционную петлю на 1 мкл ночным ростком (см. изображение ниже), добавьте его к 180 мкл смеси ELB-лизоцима в 1,5 мл стерильной микроцентрифужной пробирки. Вortexируйте на высокой скорости в течение примерно 5-10 секунд.



**Рисунок 1:** Рекомендуемое количество ночной бактериальной культуры в 1 мкл инокуляционной петли для выделения ДНК

- 7.2.2.5. Инкубируйте при  $56^{\circ}\text{C} \pm 1$  в течение 30 минут.
- ПРИМЕЧАНИЕ:** Для лучшего лизиса клеток рекомендуется перемешивать вортексом каждые 10 минут в течение всего процесса инкубации.
- 7.2.2.6. Добавьте 4 мкл раствора РНКазы А и перемешивайте вихрем на средней скорости (например, скорость "7" на приборе Daigger Vortex Genie) в течение 5-10 секунд.
- 7.2.2.7. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 3-5 минут.
- 7.2.2.8. Добавьте 25 мкл протеиназы К и 200 мкл AL-буфера и перемешивайте на средней скорости в течение 5-10 секунд.
- ПРИМЕЧАНИЕ:** Проведите вихревое перемешивание сразу после добавления буфера AL к каждому образцу для увеличения выхода ДНК. Не

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 7 из 24

*рекомендуется проводить вихревое перемешивание до добавления буфера AL ко всем образцам.*

7.2.2.9. Инкубируйте при  $56^{\circ}\text{C} \pm 1$  в течение 30 минут.

7.2.2.10. Добавьте 200 мкл 95-100 % этанола и перемешивайте вихрем в течение 5-10 секунд на средней скорости. Перейдите к разделу 7.2.4.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** При добавлении этанола может образоваться прозрачный или белый осадок. Важно перенести весь осадок на спин-колонку DNeasy на следующем этапе (раздел 7.2.4.1.).

### 7.2.3. Лизис клеток грамотрицательных организмов:

7.2.3.1. Разлейте 180 мкл буфера ATL в промаркированные стерильные микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл.

7.2.3.2. Заполните инокуляционную петлю 1 мкл ночного роста (рис. 1), добавьте его к 180 мкл буфера ATL в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и перемешивайте вихрем на высокой скорости в течение примерно 5-10 секунд.

7.2.3.3. Добавьте 20 мкл протеиназы K в каждую пробирку и перемешивайте на высокой скорости в течение 5-10 секунд.

7.2.3.4. Инкубируйте при температуре  $56^{\circ}\text{C} \pm 1$  в течение 1-3 часов, перемешивая вихрем каждые 20 минут в течение всего процесса инкубации для улучшения лизиса клеток.

7.2.3.5. Добавьте 4 мкл раствора РНКазы А и перемешивайте на средней скорости (например, '7' на приборе Daigger Vortex Genie) в течение 5-10 секунд.

7.2.3.6. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 3-5 минут.

7.2.3.7. Добавьте 200 мкл буфера AL и перемешивайте вихрем в течение 5-10 секунд.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Для увеличения выхода ДНК сразу после добавления буфера AL к каждому образцу проведите вихревое перемешивание. Не рекомендуется проводить вихревое перемешивание до добавления буфера AL ко всем образцам.

7.2.3.8. Добавьте 200 мкл 95 % - 100 % этанола и перемешайте вихрем 5-10 секунд.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** При добавлении буфера AL может образоваться прозрачный или белый осадок. На следующем этапе необходимо перенести весь осадок на спин-колонку DNeasy.

### 7.2.4. Очистка и элюирование ДНК:

7.2.4.1. Залейте смесь в спин-колонку DNeasy, установленную в пробирке для сбора 2 мл.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Убедитесь, что смесь хорошо взвешена перед переносом в спин-колонку.

7.2.4.2. Центрифугируйте при 10 000 об/мин в течение 1 минуты и выбросьте проточную жидкость и пробирку для сбора.

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 8 из 24

- 7.2.4.3. Поместите спин-колонку DNeasy в новую пробирку объемом 2 мл и добавьте 500 мкл буфера AW1 (перед использованием переверните буфер несколько раз для перемешивания).
- 7.2.4.4. Центрифугируйте при 10 000 об/мин в течение 1 минуты и отбросьте проточную жидкость и пробирку для сбора.
- 7.2.4.5. Поместите спин-колонку DNeasy в новую пробирку для сбора материала объемом 2 мл и добавьте 500 мкл буфера AW2 (перед использованием несколько раз переверните буфер для перемешивания).
- 7.2.4.6. Центрифугируйте при 13 000 - 14 000 об/мин в течение 3 минут, чтобы собрать поток в пробирку для сбора и высушить мембрану. Выбросьте проточную жидкость и пробирку для сбора.  
**ВАРИАНТ:** Во время этого этапа подготовьте пробирку с достаточным количеством 10 мМ Трис-НСl рН 8,0 для 100 мкл каждого образца + 1 дополнительный, и инкубируйте при 56°C ± 1°C, пока образцы центрифугируются. Это делается для того, чтобы довести элюирующий буфер (10 мМ TRis-НСl рН 8.0) до оптимальной температуры элюирования.
- 7.2.4.7. Поместите спин-колонку DNeasy в чистую промаркированную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и добавьте 100 мкл предварительно подогретого 10 мМ Трис-НСl рН 8,0 непосредственно на мембрану DNeasy. Следите за тем, чтобы не касаться мембраны кончиком пипетки.
- 7.2.4.8. Инкубируйте при комнатной температуре в течение 3 - 5 мин.
- 7.2.4.9. Центрифугируйте при 10 000 - 11 000 об/мин в течение 1 минуты, чтобы собрать элюат в новую пробирку.
- 7.2.4.10. В это время можно проверить качество и количество ДНК. Если секвенирование ДНК планируется провести в течение 1 недели после выделения, ее можно хранить при температуре 2 - 8°C. Для длительного хранения храните ее при температуре от -15 до -80°C, избегая повторных замораживаний-оттаиваний.

### 7.3. Контроль качества ДНК

#### 7.3.1. Определение качества ДНК с помощью спектрофотометра NanoDrop™ 2000.

- 7.3.1.1. Выберите значок NanoDrop 2000 на рабочем столе рабочей станции NanoDrop. Выберите на экране соответствующее приложение, в данном случае "Нуклеиновая кислота", и следуйте подсказкам для начала инициализации. Когда вас спросят, хотите ли вы открыть последнюю рабочую книгу, выберите "да", если хотите добавить результаты к ранее сохраненным данным, или "нет", если хотите начать новую рабочую книгу.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** Во время инициализации рычаг NanoDrop должен быть опущен.

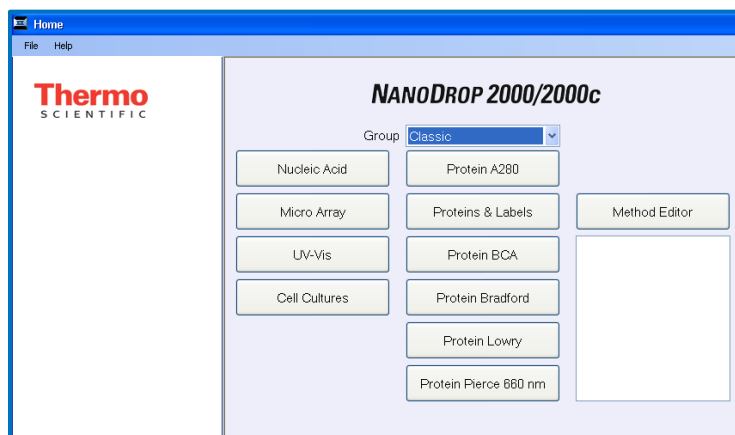
**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК**

Док. № PNL33

Вер. № 02

Дата вступления в силу:  
12/7/2021

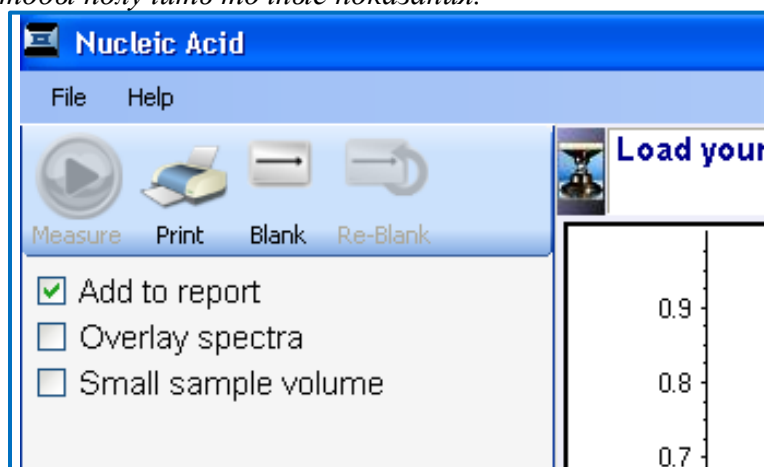
Страница 9 из  
24



**Рисунок 2:** Снимок экрана работы NanoDrop™ 2000

- 7.3.1.2. Поднимите рычаг NanoDrop и протрите верхний и нижний пьедесталы безворсовой лабораторной салфеткой, смоченной дистиллированной H<sub>2</sub>O.
- 7.3.1.3. Пипетируйте 1-2 мкл холостого раствора (например, 10 мМ Трис-НСl рН 8,0) на нижний пьедестал и опустите манипулятор после загрузки. Убедитесь, что в верхнем левом квадранте экрана выбран пункт "Добавить в отчет", чтобы сохранить результаты измерений, и нажмите кнопку "Blank" на экране (вверху слева).

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Убедитесь, что в образце на подставке нет пузырьков, чтобы получить точные показания.



**Рисунок 3:** Снимок экрана работы NanoDrop™ 2000 (продолжение)

- 7.3.1.4. После считывания прибором холостой пробы поднимите рычаг и протрите подставку и рычаг сухой лабораторной салфеткой, чтобы подготовить NanoDrop к измерению образцов.
- 7.3.1.5. Пипетируйте 1-2 мкл неразбавленного образца ДНК на нижний пьедестал и опустите манипулятор.
- 7.3.1.6. Введите название образца в поле "Sample ID" (справа вверху) и нажмите "Measure" (слева вверху). После измерения на экране появятся результаты.

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 10 из 24

- 7.3.1.7. После измерения первого образца появится подсказка: следуйте подсказке, чтобы сохранить рабочую книгу. Прежде чем продолжить работу, необходимо сохранить рабочую книгу.
- 7.3.1.8. Протрите оба пьедестала безворсовой салфеткой, смоченной деионизированной водой, и повторите шаги 7.3.1.5 - 7.3.1.8 для всех образцов.
- 7.3.1.9. После измерения всех образцов нажмите на значок "Отчеты" в левом нижнем квадранте экрана, чтобы распечатать и/или экспортировать данные, если это необходимо.
- 7.3.1.10. Запишите данные либо с помощью электронного экспорта, как описано ниже, либо вручную.
- 7.3.1.10.1. Нажмите на значок "Отчеты" в левом нижнем квадранте экрана.
- 7.3.1.10.2. Выберите "Экспорт".
- 7.3.1.10.3. Сохраните рабочую книгу NanoDrop в соответствующем сетевом пространстве или на флэш-накопителе.
- 7.3.1.11. Перенесите данные в соответствующий журнал или рабочую книгу подготовки библиотеки WGS.
- 7.3.1.12. Показания для поля 260/280 должны составлять **от 1,75 до 2,05 (с учетом погрешности 0,05 или 3 %)**, чтобы выделенная ДНК была признана "чистой" и пригодной для WGS. Если соотношение ниже 1,75, это может указывать на присутствие белка, фенола или других загрязняющих веществ, которые сильно поглощают при 280 нм или вблизи него.
- ПРИМЕЧАНИЕ1:** *если значения 260/280 постоянно находятся в пределах нормы в течение нескольких серий, то нет необходимости регулярно считывать значения на NanoDrop для последующих экстракций.*
- ПРИМЕЧАНИЕ2:** *если значения 260/280 выходят за пределы допустимого диапазона, экстракт ДНК можно очистить с помощью набора Zymo DNA Clean & Concentrator®-5 Kit (инструкции см. в Приложении PNL33-2).*
- 7.3.2. Определение качества ДНК с помощью спектрофотометра NanoDrop™ One.**
- 7.3.2.1. Коснитесь экрана, чтобы активировать прибор.
- 7.3.2.2. Выберите вкладку "Нуклеиновые кислоты" на главном экране.
- 7.3.2.3. Выберите "dsDNA".
- 7.3.2.4. Поднимите рычаг прибора и очистите верхний и нижний пьедесталы новой безворсовой лабораторной салфеткой, смоченной дистиллированной H<sub>2</sub>O.
- 7.3.2.5. Нанесите 1-2 мкл холостого раствора (например, 10 мМ Трис-HCl pH 8,0) на нижний пьедестал и опустите манипулятор.
- 7.3.2.6. Дайте прибору выполнить этап автоматической очистки.
- ПРИМЕЧАНИЕ:** *Функция автоматической очистки включена для данного прибора. Не изменяйте эту настройку. Если функция автоматической очистки была отключена, нажмите "Blank" и дайте прибору завершить измерение.*
- 7.3.2.7. Поднимите манипулятор и очистите оба постаменты безворсовой лабораторной салфеткой.

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 11 из 24

- 7.3.2.8. Нажмите на поле "Имя образца", чтобы отобразить клавиатуру.
- 7.3.2.9. Введите имя образца.
- 7.3.2.10. Нажмите кнопку "Готово".
- 7.3.2.11. Нанесите 1-2 мкл образца ДНК на пьедестал и опустите манипулятор.
- 7.3.2.12. Позвольте прибору выполнить этап автоизмерения.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Функция автоизмерения включена для данного прибора. Не изменяйте эту настройку. Если функция автоизмерения была отключена, нажмите "Измерить" и дайте прибору завершить измерение.*
- 7.3.2.13. Повторяйте шаги 7.3.2.7 - 7.3.2.12, пока не будут измерены все образцы.
- 7.3.2.14. Нажмите кнопку "Завершить эксперимент" после того, как все образцы будут измерены.
- 7.3.2.15. Поднимите манипулятор и очистите оба постаменты чистой безворсовой салфеткой, смоченной дистиллированной H(2)O.
- 7.3.2.16. Запишите данные либо с помощью электронного экспорта, как описано ниже, либо вручную.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Следующие шаги подробно описывают экспорт данных сразу по окончании эксперимента. Инструкции по сохранению эксперимента для последующего экспорта см. в руководстве пользователя NanoDrop™ One.*
- 7.3.2.16.1. Вставьте флэш-накопитель в USB-порт.
- 7.3.2.16.2. Нажмите "Экспорт" и выберите формат файла .csv.
- 7.3.2.16.3. Снова нажмите "Экспорт".
- 7.3.2.16.4. Нажмите "ОК" после появления сообщения об успешном экспорте.
- 7.3.2.16.5. Извлеките флэш-накопитель.
- 7.3.2.16.6. Нажмите "Завершить эксперимент".
- 7.3.2.17. Перенесите данные в соответствующий лист журнала, рабочий лист или рабочую книгу для подготовки библиотеки WGS.
- 7.3.2.18. Показания для поля 260/280 должны составлять **от 1,75 до 2,05 (это с учетом погрешности 0,05 или 3 %)**, чтобы выделенная ДНК была признана "чистой" и пригодной для WGS. Если соотношение ниже 1,75, это может указывать на присутствие белка, фенола или других загрязняющих веществ, которые сильно поглощают при 280 нм или вблизи него.  
**ПРИМЕЧАНИЕ1:** *если значения 260/280 постоянно находятся в пределах нормы в течение нескольких серий, то нет необходимости регулярно считывать значения на NanoDrop для последующих экстракций.*  
**ПРИМЕЧАНИЕ2:** *если значения 260/280 выходят за пределы допустимого диапазона, экстракт ДНК можно очистить с помощью набора Zymo DNA Clean & Concentrator®-5 Kit (инструкции см. в Приложении PNL33-2).*
- 7.3.3. **Подготовка образцов и стандартов для количественного определения ДНК с помощью флуорометра Qubit™ 2.0, 3.0 или 4.0.**  
**ПРИМЕЧАНИЕ1:** *Набор широкого диапазона (BR) предназначен для точного определения исходных концентраций образцов от 100 нг/мкл до 1 000 нг/мкл.*

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 12 из 24

Используйте для количественного определения продукта, содержащего более высокую концентрацию ДНК (например, экстракты гДНК).

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Высокочувствительный набор (HS) предназначен для точного определения исходных концентраций образцов от 10 нг/мкл до 100 нг/мкл.

Используйте для количественного определения продукта, содержащего меньшую концентрацию ДНК (например, продукта ПЦР, библиотеки секвенирования ДНК).

- 7.3.3.1. Установите и промаркируйте одну пробирку для каждого образца и двух стандартов.
- 7.3.3.2. Приготовьте рабочий раствор Qubit, используя соотношение реагента Qubit и буфера Qubit 1:200 для каждого образца и двух стандартов. Пример расчетов см. в таблице 2.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Храните реагент HS/BR вдали от света, так как он содержит флуоресцентные компоненты.

Реагенты	1x	Пример: 8 образцов + 2 стандарта
Реагент Qubit HS или BR	1 мкл	= 10 мкл
Буфер Qubit HS или BR	199 мкл	= 1990 мкл
<b>Общий объем (рабочий раствор)</b>	200 мкл	= 2000 мкл

**Таблица 2:** Общий объем реагента Qubit и буфера, необходимый для приготовления рабочего раствора для 8 образцов и 2 стандартов.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Рекомендуется увеличить количество образцов, используемых в расчетах, как минимум на один, чтобы обеспечить достаточный объем.

- 7.3.3.3. Для каждого стандарта дозируйте 190 мкл рабочего раствора и добавьте 10 мкл стандартов Qubit в соответствующие пробирки.
- 7.3.3.4. Дозируйте 198 мкл рабочего раствора и 2 мкл исходной ДНК в каждую пробирку с образцом. Конечный объем каждого образца и стандарта должен составлять 200 мкл.
- 7.3.3.5. Перемешайте все пробирки в течение 2 - 3 секунд.
- 7.3.3.6. Инкубируйте все пробирки не менее 2 минут при комнатной температуре и считайте данные в течение 1 часа. Такой короткий промежуток времени необходим для того, чтобы минимизировать воздействие света на реагент.

**ПРИМЕЧАНИЕ1:** Убедитесь, что анализ проводится исключительно при комнатной температуре. Не нагревайте и не держите пробирки в руках перед измерением, так как нагревание раствора приводит к снижению показаний.

**ПРИМЕЧАНИЕ2:** Через 1 час температура внутри флуорометра Qubit может быть на 3°C выше комнатной. По этой причине, если вы хотите провести несколько измерений одной пробирки, извлеките ее из прибора и дайте ей уравновеситься до комнатной температуры в течение 30 секунд, прежде чем проводить повторное измерение.

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК**

Док. № PNL33

Вер. № 02

Дата вступления в силу:  
12/7/2021

Страница 13 из  
24

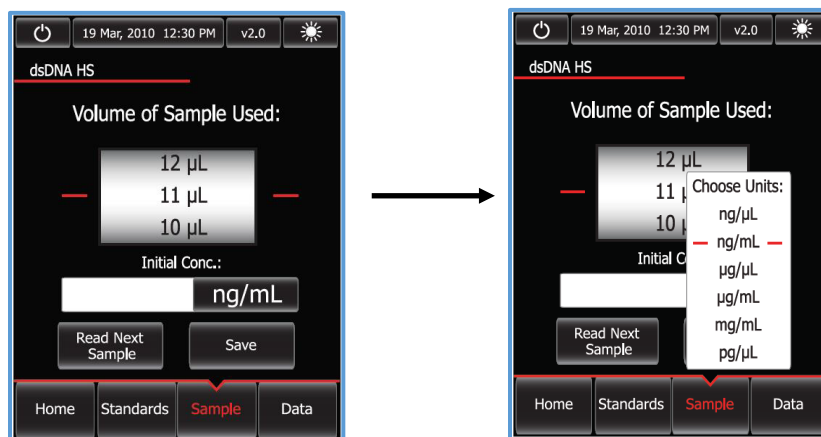
### 7.3.4. Работа с флуорометром Qubit™ 2.0

- 7.3.4.1. Коснитесь экрана, чтобы активировать прибор.
- 7.3.4.2. Когда появится запрос на выбор типа образца, выберите "ДНК".
- 7.3.4.3. Когда появится запрос на выбор типа анализа, выберите "dsDNA Broad Range" или "dsDNA High Sensitivity" в зависимости от используемого анализа.
- 7.3.4.4. На вопрос, доступны ли новые стандарты, выберите "Да".
- 7.3.4.5. Вставьте стандарт 1 и нажмите "Read".
- 7.3.4.6. Вставьте стандарт 2 и нажмите "Read".

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Если прибор не может считать стандарты, начните процесс сначала, подготовив новые стандарты и образцы, используя инструкции, описанные в шаге 7.3.3.

- 7.3.4.7. Вставьте пробирку с образцом в камеру для образцов, закройте крышку и нажмите кнопку "Read".
- 7.3.4.8. После завершения первичного считывания нажмите "Рассчитать концентрацию пробы".
- 7.3.4.9. Выберите объем образца (1-20 мкл) на колесике ролика объема и нужные единицы измерения в выпадающем меню (нажмите на отображаемые единицы, чтобы ввести запрос).

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Единицы можно перевести в нг/мкл (или другие единицы), нажав на кнопку, отображающую единицы (рядом с показаниями концентрации), и выбрав нужную единицу во всплывающем окне (см. ниже).



**Рисунок 4:** Снимок экрана флуорометра Qubit™ 2.0 для выбора объема образца и единиц измерения.

- 7.3.4.10. Нажмите кнопку "Сохранить". Появится индикатор выполнения, показывающий, что отображаемые данные сохраняются в приборе.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** Кнопку "Сохранить" можно нажимать несколько раз, не создавая дублирующих записей.
- 7.3.4.11. Приступайте к считыванию следующего образца, меняя местами пробирки, выбирая "Read Next Sample" и повторяя шаги 7.3.4.7 - 7.3.4.10, пока все образцы не будут считаны.

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 14 из 24

- 7.3.4.12. Когда все образцы будут считаны, нажмите кнопку "Данные" в правом нижнем углу экрана.
- 7.3.4.13. Вставьте флэш-накопитель в указанный слот. Выделите показания для интересующих вас образцов и нажмите на значок флэш-накопителя в левой нижней части экрана, чтобы перенести данные. На экране будет отображаться индикатор выполнения, показывающий состояние процесса.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** Зеленая точка на значке USB означает, что прибор распознает флэш-накопитель. Если флэш-накопитель отсутствует, вставлен неправильно или не распознается, вместо него будет отображаться красная точка.
- 7.3.4.14. Извлеките флэш-накопитель. Сохраненный файл .CSV теперь можно открыть в Microsoft Excel на любой компьютерной рабочей станции.
- 7.3.4.15. Образцы перечислены сверху вниз **в порядке от самого последнего показания к начальному.**
- 7.3.4.16. Переименуйте образцы соответствующим образом. При открытии файла в Excel в столбце "Имя" по умолчанию будут указаны имена образцов, в которые они были считаны.
- 7.3.4.17. Эти концентрации ДНК могут быть записаны в соответствующих рабочих книгах по подготовке библиотек WGS.  
**ВАРИАНТ:** Концентрацию ДНК можно также записать вместо использования флэш-накопителя, в основном для ситуаций, когда количественному анализу подвергаются лишь несколько образцов.
- 7.3.4.18. Идеальная концентрация -  $\geq 10$  нг/мкл.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** если концентрация ДНК низкая, экстракт ДНК можно сконцентрировать с помощью набора Zymo DNA Clean & Concentrator®-5 Kit (инструкции см. в приложении PNL33-2).

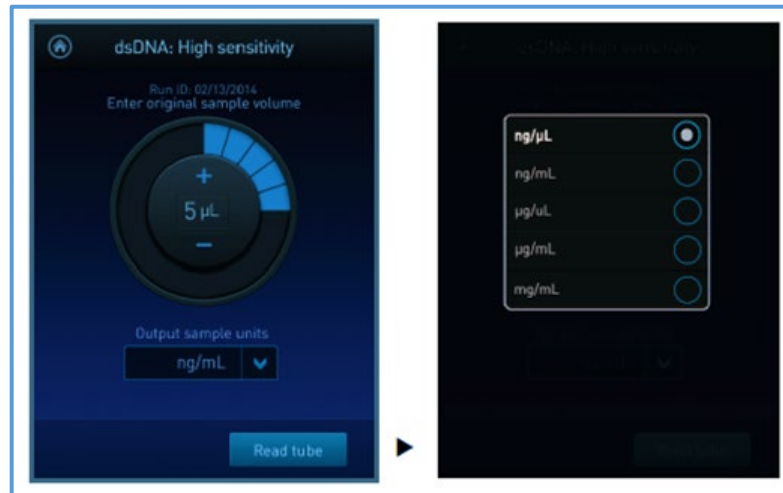
### 7.3.5. Работа с флуорометром Qubit™ 3.0 и 4.0

- 7.3.5.1. Коснитесь экрана, чтобы активировать прибор.
- 7.3.5.2. При появлении запроса на выбор типа образца выберите "dsDNA".
- 7.3.5.3. При появлении запроса на выбор типа анализа выберите "dsDNA Broad Range" или "dsDNA High Sensitivity" в зависимости от используемого анализа.
- 7.3.5.4. Выберите пункт "Считать стандарты".
- 7.3.5.5. В ответ на запрос вставьте стандарт 1 и выберите "read standard 1".
- 7.3.5.6. В ответ на запрос введите стандарт 2 и выберите "read standard 2".  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** Если прибор не может считать стандарты, начните процесс сначала, подготовив новые стандарты и образцы, используя инструкции, описанные в шагах 7.3.3.
- 7.3.5.7. Выберите "Выполнить образцы".
- 7.3.5.8. На экране объема образца выберите объем образца (1-20 мкл), нажимая кнопки + или - на колесике.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** При использовании Qubit™ 4 на главном экране есть опция, которая может быть использована для расчета объема,

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 15 из 24

необходимого для использования "Qubit 1X dsDNA Assay Kits, broad range (BR)" (шаг 6.1.11).

7.3.5.9. Выберите единицы измерения концентрации выходного образца из



выпадающего меню.

**Рисунок 5:** Снимок экрана флуорометра Qubit™ 3.0 или 4.0 для выбора объема образца и единиц измерения.

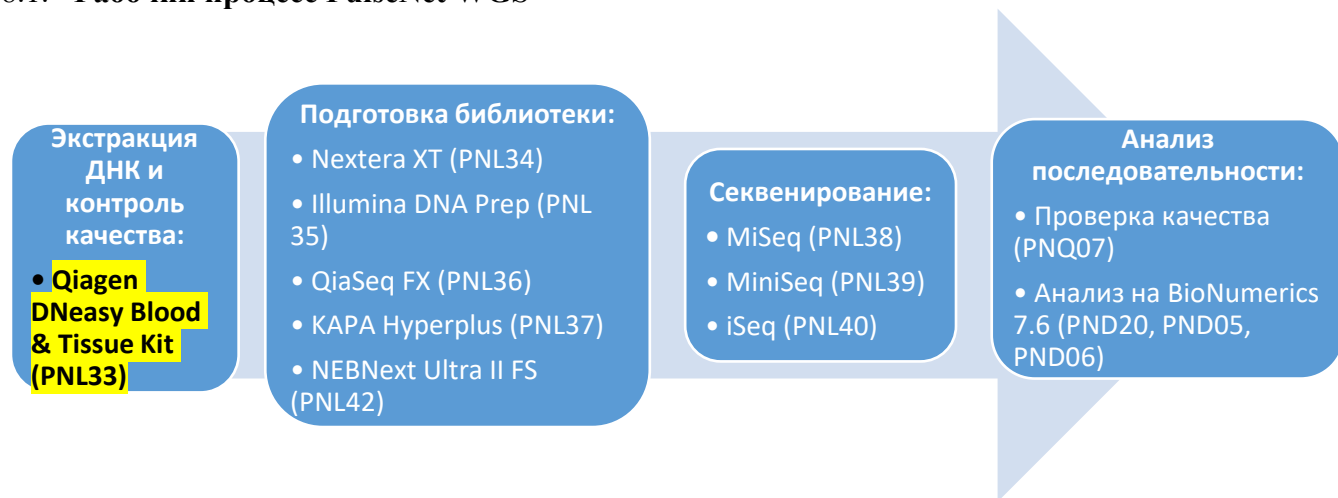
- 7.3.5.10. Вставьте пробирку с образцом в камеру для образцов, закройте крышку и выберите "Read tube".
- 7.3.5.11. Перейдите к следующему образцу и повторяйте шаг 7.3.5.10, пока не будут считаны все образцы.
- 7.3.5.12. Выберите "Данные".  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** Синий шеврон над номером образца меняет порядок ввода данных.
- 7.3.5.13. Вставьте флэш-накопитель в указанный слот и выберите "Экспорт".
- 7.3.5.14. Выберите анализ, который необходимо экспортировать на флэш-накопитель.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** На экране будут отображены все анализы, сохраненные в приборе, в хронологическом порядке, самые последние будут находиться сверху.
- 7.3.5.15. Выберите "Экспорт".  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** На экране экспорта данных отображается количество успешно сохраненных образцов на флэш-накопителе.
- 7.3.5.16. Выберите "Готово".
- 7.3.5.17. Коснитесь значка "Домой".
- 7.3.5.18. Извлеките флэш-накопитель. Сохраненный файл .CSV теперь можно открыть в Microsoft Excel на любой компьютерной рабочей станции.
- 7.3.5.19. Образцы перечислены сверху вниз **в порядке от самого последнего прочтения к первому.**

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 16 из 24

- 7.3.5.20. Переименуйте образцы соответствующим образом. При открытии файла в Excel в столбце "Имя" по умолчанию будут указаны имена образцов, в которые каждый из них был считан.
- 7.3.5.21. Эти концентрации ДНК могут быть записаны в соответствующих рабочих книгах по подготовке библиотек WGS.  
**ВАРИАНТ:** Концентрацию ДНК можно также записать вместо использования флэш-накопителя, в основном для ситуаций, когда количественному анализу подвергаются лишь несколько образцов.
- 7.3.5.22. Идеальная концентрация -  $\geq 10$  нг/мкл.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** если концентрация ДНК низкая, экстракт ДНК можно сконцентрировать с помощью набора Zymo DNA Clean & Concentrator®-5 (инструкции см. в Приложении PNL33-2).

## 8. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ КАРТЫ:

### 8.1. Рабочий процесс PulseNet WGS



### 8.2. Экстракция ДНК с помощью набора Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК**

Док. № PNL33

Вер. № 02

Дата вступления в силу:  
12/7/2021

Страница 17 из  
24



**9. СОПУТСТВУЮЩИЕ ДОКУМЕНТЫ:**

Номер документа	Название
PNL34	СОП по подготовке библиотек Nextera XT
PNL34.W1	Рабочая тетрадь по подготовке библиотеки Nextera XT
PNL35	СОП по подготовке ДНК Illumina (DNA Flex)
PNL35.W1	Illumina DNA Prep Workbook, 96 CD/UD Indexes
PNL35.W2	Illumina DNA Prep Workbook, 24 CD Indexes
PNL35.W3	Рабочая тетрадь по подготовке ДНК Illumina
PNL36	СОП по подготовке библиотек QIAseq FX
PNL36.W1	Рабочая тетрадь по подготовке библиотек QIAseq FX
PNL37	СОП по подготовке библиотек KAPA HyperPlus
PNL37.W1	Рабочая тетрадь по подготовке библиотеки KAPA HyperPlus
PNL42	СОП подготовки библиотеки NEB Next Ultra II FS
PNL42.W1	Рабочая тетрадь по подготовке библиотеки NEB Next Ultra II FS
PNL38	Секвенирование на MiSeq SOP
PNL39	Секвенирование на MiniSeq SOP
PNL40	Секвенирование на iSeq SOP
PNQ07	СОП по контролю качества данных последовательностей Illumina

<b>СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК</b>			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 18 из 24

PND20	Рабочий процесс базы данных BioNumerics RefID SOP
PND05	BioNumerics Organism-Specific Database Workflow SOP

## 10. ПОЛЕЗНЫЕ ДОКУМЕНТЫ:

- 10.1. DNeasy Blood & Tissue Handbook. Qiagen.  
<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=68f29296-5a9f-40fa-8b3d-1c148d0b3030&lang=en>
- 10.2. Wizard® Genomic DNA Purification Kit Technical Manual. Promega Corporation.  
[https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf?sc\\_lang=en?la=en](https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/wizard-genomic-dna-purification-kit-protocol.pdf?sc_lang=en?la=en).
- 10.3. DNA Clean and Concentrator®-5 Technical Manual. Zymo Research.  
[https://files.zymoresearch.com/protocols/\\_d4003t\\_d4003\\_d4004\\_d4013\\_d4014\\_dna\\_clean\\_concentrator\\_-5.pdf](https://files.zymoresearch.com/protocols/_d4003t_d4003_d4004_d4013_d4014_dna_clean_concentrator_-5.pdf).
- 10.4. NanoDrop™ 2000/2000c Spectrophotometers – User Manual. ThermoFisher Scientific.  
<https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FCAD%2Fmanuals%2FNanoDrop-2000-User-Manual-EN.pdf&title=TmFub0Ryb3AgMjAwMC8yMDAwYyBTcGVjdHJvcGhvdG9tZXRIcnMgLSBVc2VyIE1hbVhVbA==>
- 10.5. NanoDrop™ One with NanoDrop QC Software – User Guide. ThermoFisher Scientific.  
<https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FMSD%2Fmanuals%2Fnanodrop-qc-user-guide-EN.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogTmFub0Ryb3AgUUMgU3BIY3Ryb3Bob3RvbWV0ZXI==>
- 10.6. User Guide – Cubit™ 3 Fluorometer. ThermoFisher Scientific.  
[https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FBID%2Fmanuals%2FMAN0010866\\_Qubit\\_3\\_Fluorometer\\_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUXVhXQgMyBGbHVvcM9tZXRIcG==](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FBID%2Fmanuals%2FMAN0010866_Qubit_3_Fluorometer_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUXVhXQgMyBGbHVvcM9tZXRIcG==)
- 10.7. User Guide – Cubit™ 4 Fluorometer. ThermoFisher Scientific.  
[https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0017209\\_Qubit\\_4\\_Fluorometer\\_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUXVhXQgNCBGBHVvcM9tZXRIcG==](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0017209_Qubit_4_Fluorometer_UG.pdf&title=VXNlciBHdWlkZTogUXVhXQgNCBGBHVvcM9tZXRIcG==)

## 11. КОНТАКТЫ:

- 11.1. PulseNet NGS Lab:  
[pulsenetngslab@cdc.gov](mailto:pulsenetngslab@cdc.gov)

## 12. ПОПРАВКИ:

### 12.1. 01/24/2019:

- Процедуры экстракции и контроля качества ДНК перенесены из PNL32 в отдельный документ (PNL33).

<b>СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК</b>			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 19 из 24

### 12.2. 12/01/2021

- Обновлены каталожные номера и контакты
- Добавлены инструкции для Cubit™ 4
- Добавлены блок-схемы, сопутствующие документы и ссылки

### 13. ПОДПИСИ ДЛЯ УТВЕРЖДЕНИЯ:

Утверждено: \_\_\_\_\_ Дата: \_\_\_\_\_  
Персонал отдела контроля качества/КК компании PulseNet

Утверждено: \_\_\_\_\_ N/A \_\_\_\_\_ Дата: \_\_\_\_\_  
Руководитель группы обнаружения и наблюдения за вспышками заболеваний PulseNet

Утверждено \_\_\_\_\_ Дата: \_\_\_\_\_  
Руководитель группы по методам субтипирования следующего поколения PulseNet

Утверждено \_\_\_\_\_ Дата: \_\_\_\_\_  
Руководитель группы по надзору за вспышками заболеваний PulseNet

### Приложение PNL33-1

#### Экстракция ДНК с помощью набора Promega Wizard® Genomic DNA Purification Kit

#### 1. Процедура

##### 1.1. Подготовка изолята

1.1.1. Нанесите изолированную колонию из тестовых культур на пластину TSA-SB (или сопоставимую среду). Инкубируйте культуры при 37-42°C ± 1 в течение 16-24 часов.

**ПРИМЕЧАНИЕ:** При использовании культуры из бульона см. шаг 1.2.1.1.2. для грамотрицательных бактерий и шаг 1.2.2.3.2. для грамположительных бактерий.

##### 1.2. Экстракция ДНК

##### 1.2.1. Лизис клеток для грамотрицательных бактерий

1.2.1.1. Соберите культуру бактерий:

1.2.1.1.1. Высеять культуру:

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК**

Док. № PNL33

Вер. № 02

Дата вступления в силу:  
12/7/2021

Страница 20 из  
24

- 1.2.1.1.1.1. Наберите 600 мкл раствора для нуклеинового лизиса в стерильные микропробирки объемом 1,5 мл.
  - 1.2.1.1.1.2. Заполните инокуляционную петлю объемом 10 мкл примерно на одну четвертую часть роста и добавьте в раствор нуклеинового лизиса.
  - 1.2.1.1.2. Бульонная культура:
    - 1.2.1.1.2.1. Добавьте 1 мл бульонной культуры в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.
    - 1.2.1.1.2.2. Центрифугируйте при 13 000-14 000 x g (10 000-11 000 об/мин) для гранулирования клеток. Удалите и выбросьте как можно больше надосадочной жидкости, не перемешивая клетки.
    - 1.2.1.1.2.3. Ресуспендируйте в 600 мкл раствора для лизиса ядер.
  - 1.2.1.2. Перемешивайте вихрем в течение 5-10 секунд или пипеткой вверх-вниз до появления гомогенизированного раствора.
  - 1.2.1.3. Инкубируйте образец при 80° C ± 1 в течение 5 минут для лизиса клеток.  
**ВАРИАНТ:** *Инкубирование при 60° C ± 1 в течение 45 минут (вместо 80° C ± 1 в течение 5 минут) может улучшить лизис клеток.*
  - 1.2.1.4. Охладите образец, инкубируя его на льду в течение 1 минуты или на столе в течение 5 минут.
  - 1.2.1.5. Добавьте 3 мкл раствора РНКазы А к клеточному лизату и перемешайте, перевернув пробирку 25 раз.
  - 1.2.1.6. Инкубируйте при 37° C ± 1 в течение 15-60 минут.
- 1.2.2. **Лизис клеток грамположительных бактерий**
- 1.2.2.1. Разведите достаточное количество 50 мМ ЭДТА, рН 8,0, для количества проводимых экстракций.
    - 1.2.2.1.1. 50 мМ ЭДТА, рН 8,0 = 100 мкл 0,5 М ЭДТА + 900 мкл воды молекулярного класса. Перемешайте несколько раз инвертированием и храните при комнатной температуре (15-30°С).
  - 1.2.2.2. Приготовьте достаточное количество 20 мг/мкл раствора лизоцима (раствор литического фермента), добавив порошок лизоцима к 50 мМ ЭДТА, рН 8,0, в соответствии с приведенной ниже таблицей.  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Для полного растворения лизоцима в растворе может потребоваться до 10 минут.*

Количество образцов + 1	Общий объем 50 мМ ЭДТА (мкл)	Лизоцим (мг)
5 + 1 = 6	1080	21.6
10 + 1 = 11	1980	39.6
18 + 1 = 19	3420	68.4
20 + 1 = 21	3780	75.6

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 21 из 24

**Таблица 1:** Объем ЭДТА и лизоцима, необходимый для приготовления раствора литического фермента для разного количества образцов

1.2.2.3. Соберите бактериальную культуру:

1.2.2.3.1. Разместите культуру на планшет:

1.2.2.3.1.1. Внесите 420 мкл 50 мМ ЭДТА, рН 8,0 в стерильные микропробирки объемом 1,5 мл.

1.2.2.3.1.2. Заполните инокуляционную петлю объемом 10 мкл примерно на четверть ростом и добавьте к 50 мМ ЭДТА.

1.2.2.3.2. Бульонная культура:

1.2.2.3.2.1. Добавьте 1 мл бульонной культуры в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл.

1.2.2.3.2.2. Центрифугируйте при 13 000-14 000 x g (10 000-11 000 об/мин) для гранулирования клеток. Удалите и выбросьте как можно больше надосадочной жидкости.

1.2.2.3.2.3. Ресуспендируйте клетки в 420 мкл 50 мМ ЭДТА, рН 8,0.

1.2.2.4. Аккуратно перемешайте клетки пипеткой и/или вортексом, пока они не будут ресуспендированы.

1.2.2.5. Добавьте 180 мкл раствора литического фермента в каждый образец и перемешайте вихрем.

1.2.2.6. Инкубируйте образец при 56°C ± 1 в течение 60 минут для лизиса внешней клеточной стенки.

1.2.2.7. Центрифугируйте образец при 13 000-16 000 x g (10 000-11 000 об/мин) в течение 1 минуты. Удалите и отбросьте как можно больше супернатанта.

1.2.2.8. Добавьте 600 мкл раствора для лизиса ядер. Аккуратно пипетируйте вверх и вниз, пока клетки не будут ресуспендированы.

1.2.2.9. Инкубируйте при 60°C ± 1 в течение 45 минут для лизиса клеток.

1.2.2.10. Охладите образец, инкубируя его на льду в течение 1 минуты или на столе в течение 5 минут.

1.2.2.11. Добавьте 3 мкл раствора РНКазы А, 4 мг/мл, в лизат клеток и перемешайте, перевернув пробирку 25 раз.

1.2.2.12. Инкубируйте при 37° С ± 1 в течение 30-90 минут.

### 1.2.3. Осаждение белка

1.2.3.1. Охладите образец, поместив его на лед на 1 минуту или на стенд на 5 минут.

1.2.3.2. Добавьте 200 мкл раствора для осаждения белков к обработанному РНКазой клеточному лизату.

1.2.3.3. Энергично перемешивайте вортексом на высокой скорости в течение 20 секунд.

1.2.3.4. Инкубируйте образец на льду в течение 10 минут.

1.2.3.5. Центрифугируйте при 13 000-16 000 x g (10 000-13 000 об/мин) в течение 3 минут. Осажденный белок должен образовать плотную гранулу.

**ВАРИАНТ:** Если белок не образовал плотную гранулу, повторите описанные выше действия, перелив супернатант, содержащий ДНК (оставив осажденную гранулу белка), в чистую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл, инкубируя образец на льду в течение 5 минут, и

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 22 из 24

*центрифугируя при 13 000-16 000 x g или 10 000-13 000 об/мин в течение 3 минут.*

#### 1.2.4. Осаждение ДНК

- 1.2.4.1. Перенесите супернатант, содержащий ДНК, в чистую микропробирку объемом 1,5 мл, содержащую 600 мкл 100%-ного изопропанола (2-пропанола).
- 1.2.4.2. Перемешайте образец, аккуратно перевернув его около 50 раз.
- 1.2.4.3. Центрифугируйте при 13 000-16 000 x g (10 000-13 000 об/мин) в течение 3 минут. Гранулы ДНК должны быть видны в виде небольших белых гранул.
- 1.2.4.4. Отлейте надосадочную жидкость. Гранулы могут быть рыхлыми, поэтому сливайте медленно, чтобы не потревожить гранулы.
- 1.2.4.5. Добавьте 600 мкл 70% этанола и переверните пробирку несколько раз, чтобы промыть гранулы.
- 1.2.4.5.1. Для приготовления 70% этанола:

Реагент	Объем на образец	Пример: 20 образцов
100% этанол	0,42 мл	8,4 мл
Молекулярная вода	0,18 мл	3,6 мл

Таблица 2. Объемы реагентов на образец для 70% этанола

- 1.2.4.6. Центрифугируйте при 13 000-16 000 x g (10 000-13 000 об/мин) в течение 1-3 минут. Осторожно слейте этанол. Сливайте медленно, так как гранулы могут быть рыхлыми.
- 1.2.4.7. Коротко прокрутите пробирку, чтобы собрать оставшийся этанол на дне пробирки. Удалите оставшийся этанол с помощью пипетки.
- 1.2.4.8. Переверните пробирку и вылейте ее на чистую впитывающую бумагу. Дайте пробирке высохнуть на воздухе в течение 10-15 минут.

#### 1.2.5. Гидратация ДНК

- 1.2.5.1. Добавьте 50-100 мкл 10 мМ Трис-НСl, рН 8,0. Пипетируйте вверх и вниз, чтобы смести гранулы ДНК со дна и/или стенок пробирки. ДНК может образовывать диффузную гранулу вдоль стенки пробирки.  
**ВАРИАНТ:** *Аликвоту 10 мМ Трис-НСl, рН 8,0 можно кратковременно (примерно 1-2 минуты) подогреть на водяной бане при 65°C ± 1, чтобы облегчить регидратацию ДНК.*
- 1.2.5.2. Проведите регидратацию ДНК, инкубируя образец в течение 1 часа при 65°C ± 1 и/или в течение ночи при комнатной температуре или 2-8°C. Периодическое постукивание по пробирке поможет диспергировать ДНК.  
**ВАРИАНТ:** *Проведите кратковременный импульсный спин, чтобы собрать образец на дне пробирки.*  
**ПРИМЕЧАНИЕ:** *Храните экстракты ДНК при температуре 2-8°C для краткосрочного хранения или при температуре от -80°C до -15°C для долгосрочного хранения (>/= 7 дней).*

**СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК**

**Док. № PNL33**

**Вер. № 02**

**Дата вступления в силу:  
12/7/2021**

**Страница 23 из  
24**

СТАНДАРТНАЯ ОПЕРАЦИОННАЯ ПРОЦЕДУРА PULSENET ПО ЭКСТРАКЦИИ ТОТАЛЬНОЙ ДНК И КОНТРОЛЮ КАЧЕСТВА ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ДНК			
Док. № PNL33	Вер. № 02	Дата вступления в силу: 12/7/2021	Страница 24 из 24

**Приложение PNL33-2**  
**Набор Zymo DNA Clean & Concentrator® -5 Процедура**

**1. Перед началом работы:**

- 1.1. Для набора 25 ррег: Добавьте 24 мл 100% этанола (26 мл 95% этанола) к 6 мл концентрата промывочного буфера для ДНК.
- 1.2. Для набора 200: Добавьте 96 мл 100% этанола (104 мл 95% этанола) к 24 мл концентрата буфера для промывки ДНК.

**2. Процедура:**

**ПРИМЕЧАНИЕ:** Все этапы центрифугирования должны проводиться при 10 000 - 16 000 x g (9 000 - 11 500 об/мин).

- 2.1. В микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл добавьте 2-5 объемов буфера для связывания ДНК ChIP к каждому объему образца ДНК (см. таблицу 1 ниже). Тщательно перемешайте.

Применение	Буфер для связывания ДНК: Образец	Пример
Плазмида, геномная ДНК (>2кб)	2 : 1	200 мкл : 100 мкл
Продукт ПЦР, фрагмент ДНК	5 : 1	500 мкл : 100 мкл

**Таблица 1:** Рекомендуемое соотношение буфера для связывания ДНК и образца

- 2.2. Перенесите эту смесь на колонку Zymo-Spin Column<sup>1</sup> в пробирке для сбора.
- 2.3. Центрифугируйте в течение 30 секунд и отбросьте проточную жидкость.
- 2.4. Добавьте в колонку 200 мкл промывочного буфера для ДНК. Центрифугируйте в течение 1 минуты и повторите этап промывки.
- 2.5. Добавьте 20 мкл 10 mM Трис-НСl pH 8,0 непосредственно на матрицу колонки (не касайтесь фильтра кончиком пипетки).
- 2.6. Инкубируйте при комнатной температуре в течение одной минуты.
- 2.7. Перенесите колонку в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугируйте в течение 30 секунд для элюирования ДНК.
- 2.8. Повторите шаги 2.5 - 2.7, элюируя в той же микроцентрифуге, чтобы получить конечный объем образца ДНК 40 мкл.
- 2.9. Теперь ДНК готова к количественному определению и последующему методу подготовки библиотеки.

<sup>1</sup>Объем колонки для образцов составляет 800 мкл. Если объем образца превышает 800 мкл, может потребоваться многократная загрузка и отжим колонки.